

Methanol-induzierte heterologe Expression von O-Methyltransferasen aus dem Sekundärstoffwechsel von *Triphyophyllum peltatum* in der Hefe *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

Kamran Heraji Esfahani, Chris Drewniok, Thomas Wiegert, Karin Fester

Hochschule Zittau/Görlitz, Fakultät Natur- und Umweltwissenschaften

01

Einleitung

Das Hakenblatt (*Triphyophyllum peltatum*) ist eine in Westafrika beheimatete Liane, die in ihrem Leben drei Entwicklungsstadien mit unterschiedlichen Blatttypen durchläuft. Nur im zweiten, optionalen Stadium ist sie karnivor, falls sie zuvor einem Phosphormangel ausgesetzt war [1]. Das Hakenblatt produziert zahlreiche Naturstoffe, von denen die Naphthylisochinolin-Alkaloide von besonderem Interesse sind, weil sie u.a. gegen parasitäre Erkrankungen wie Malaria Wirksamkeit zeigen. Eine Kultivierung dieser seltenen und gefährdeten Pflanzenart gestaltet sich jedoch schwierig, und ihr natürliches Verbreitungsgebiet beschränkt sich auf wenige westafrikanische Länder. Aus diesem Grund ist auch die Verfügbarkeit der therapeutisch wertvollen Naphthylisochinolin-Alkaloide begrenzt. Die biotechnologische Herstellung dieser Naturstoffe in gentechnisch veränderten Mikroorganismen stellt daher eine nachhaltige Ressource dar. Jedoch ist hierfür die genaue Kenntnis ihrer Biosynthese erforderlich. Eine vermutlich an der Biosynthese der Naphthylisochinolin-Alkaloide beteiligte Enzymgruppe sind die O-Methyltransferasen (OMT) [2]. In vergangenen Arbeiten wurde versucht OMTs aus cDNA-Bibliotheken in *Escherichia coli* (*E. coli*) zu exprimieren [3, 4]. Dabei kam es zur Bildung von unlöslichen inaktiven Proteinen (sog. „Inclusion Bodies“) bzw. zu geringen Proteinausbeuten oder anderen atypischen Faltungsprozessen, die potentiell auf die biochemischen Eigenschaften Einfluss nehmen könnten. Insbesondere bakterielle Systeme werden häufig zur Gewinnung rekombinanter Proteine verwendet, weil Bakterien meist ein schnelles Wachstum zeigen und ihre Kultivierung vergleichsweise einfach und kostengünstig ist. Demgegenüber stehen Nachteile wie die falsche Faltung rekombinanter Proteine, Produktion von sog. Inclusion Bodies und Vektorinstabilität bei toxischen Proteinen [5]. Um diese negativen Aspekte zu vermeiden kann man Proteine in eukaryotischen Expressionssystemen wie der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* produzieren. Dieses Expressionssystem gewährleistet eukaryotische posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierungen und Glykosylierungen. [6, 7].



Triphyophyllum peltatum, das Hakenblatt [8]

02

Ziel des Projekts

Langfristiges Ziel dieser Arbeiten ist die biotechnologische Herstellung von Naphthylisochinolin-Alkaloiden, pflanzlichen Naturstoffen aus tropischen Lianen, die in zahlreichen *in vitro*-Studien vielversprechende Wirkungen gegen Malaria und Krebs gezeigt haben. In einem ersten Schritt müssen die mikrobiellen Expressionssysteme optimiert werden.

Die O-Methyltransferase TpOMT ist ein Enzym aus dem Sekundärstoffwechsel von *Triphyophyllum peltatum* und wurde schon erfolgreich in *E. coli* produziert [9, 10]. Jedoch scheint der Faltungsprozess der TpOMT in *E. coli* nicht optimal zu funktionieren, was die Aktivität der TpOMT beeinflussen kann. Durch die Produktion der TpOMT in einem Eukaryoten wie der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* (PichiaPink™, Life Technologies [11]) können solche Fehlfaltungen vermieden werden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Optimierung der Expression der TpOMT in *P. pastoris*.

06

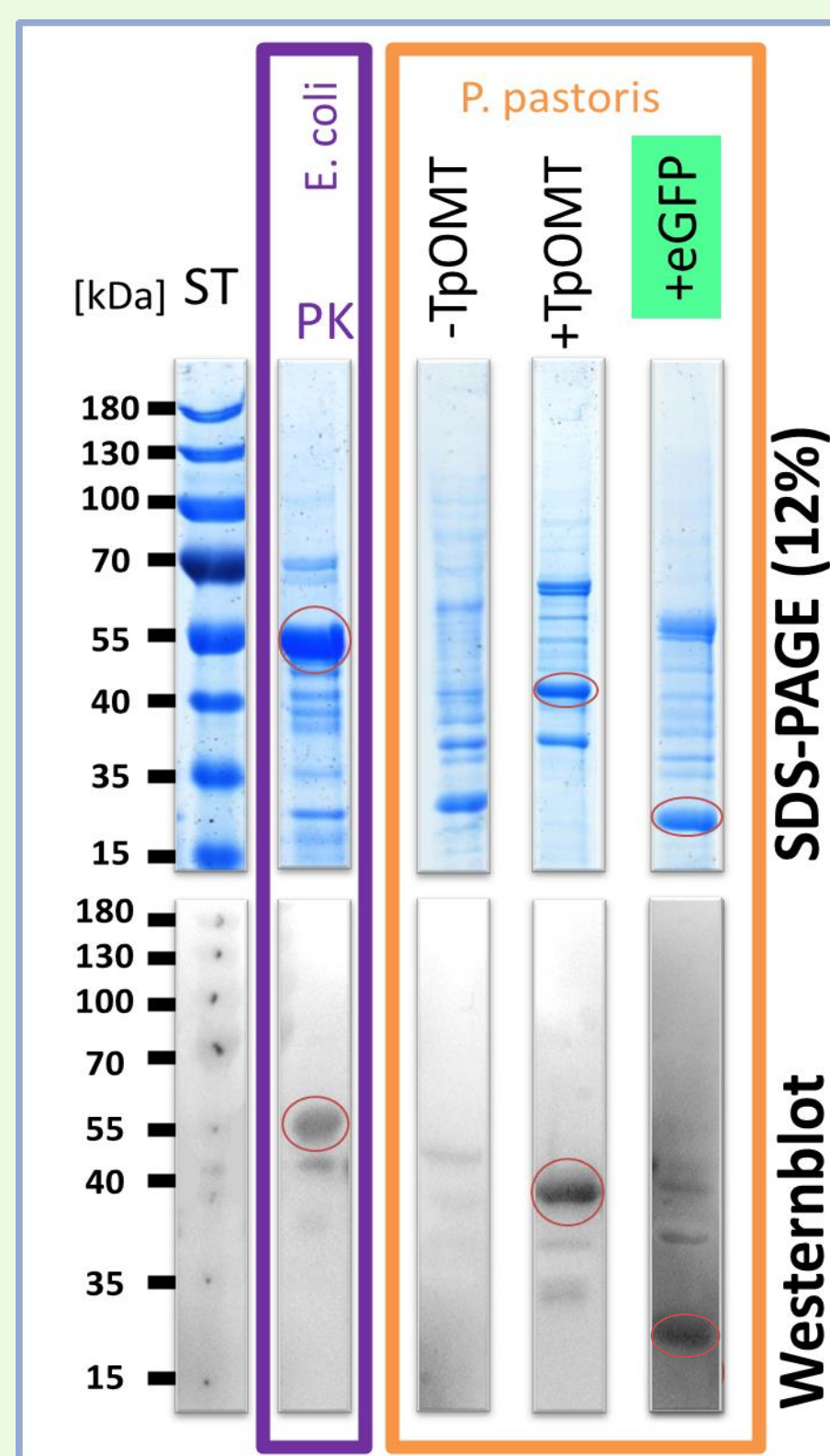
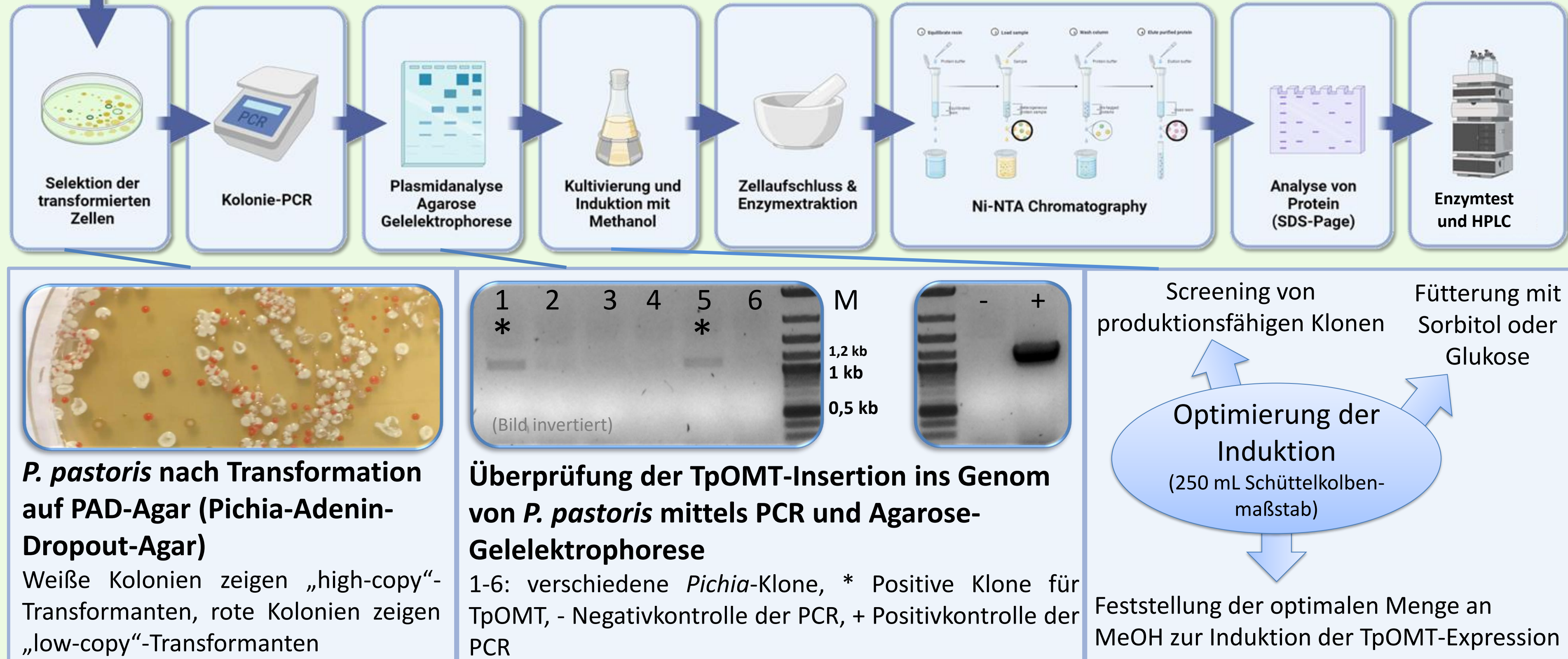
Literatur

- [1] Winkelmann T., Bringmann G., Herwig A., Hedrich R. Carnivory on demand: phosphorus deficiency induces glandular leaves in the African liana *Triphyophyllum peltatum*. New Phytologist 239 (3): 1140-1152, 2023
- [2] Ibrahim S.R.M., Mohamed G.A. Naphthylisoquinoline alkaloids potential drug leads. Fitoterapia 106: 194-225, 2015
- [3] Manaa E.M., Isolierung und Charakterisierung einer rekombinanten O-Methyltransferase aus dem Hakenblatt. Bachelorarbeit, Hochschule Zittau/Görlitz, 2022
- [4] Klos L., Biosynthese methylierter Naturstoffe in *Triphyophyllum peltatum*, Masterarbeit, Hochschule Zittau/Görlitz, 2021
- [5] Rosano G.L., Ceccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and Challenges. Frontiers in Microbiology 5:172, 2014. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172
- [6] Jansohn M., Rothhämel S. Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Aufl. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 2011
- [7] Ahmad M., Hirz M., Pichler H., Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Applied Microbiology and Biotechnology 98 (12), 5301–5317, 2014
- [8] Feineis D., Bringmann G., *Ancistrocladus* Naphthylisoquinoline Alkaloids. In: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products (eds. Kinghorn D.A., Falk H., Gibbons S., Asakawa Y., Liu J.-K., Dirsch V.M.), Volume 119, 2023, ISBN : 978-3-031-10456-5
- [9] Passolt L.M. Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Rolle der O-Methyltransferase bei der Biogenese von Naphthylisochinolin-Alkaloiden in *Triphyophyllum peltatum*. Diplom-Arbeit, Universität Leipzig, 2015
- [10] Le Tran T. Charakterisierung rekombinanter O-Methyltransferasen aus *Nepenthes alata* und *Triphyophyllum peltatum*. Diplom-Arbeit, Universität Leipzig, 2016
- [11] Life Technologies "PichiaPink™ Expression System" (manual, version 22 January 2014)

03

Ergebnisse

Arbeitsabläufe und Versuchsstrategie Im Rahmen des Projektes wurde die TpOMT in *P. pastoris* kloniert. Verschiedene *P. pastoris*-Klone wurden darauf hin untersucht, wie stark sie die TpOMT exprimieren. Von diesen Klone erwiesen sich einige als geeignete Produktionsstämme („high-copy“-Transformanten). In weiteren Versuchen wurde die Expressionsrate der Stämme optimiert. Dabei wurden verschiedene Parameter untersucht (verschiedene Konzentrationen von Methanol zur Induktion, Fütterung mit Glukose, Fütterung mit Sorbitol).

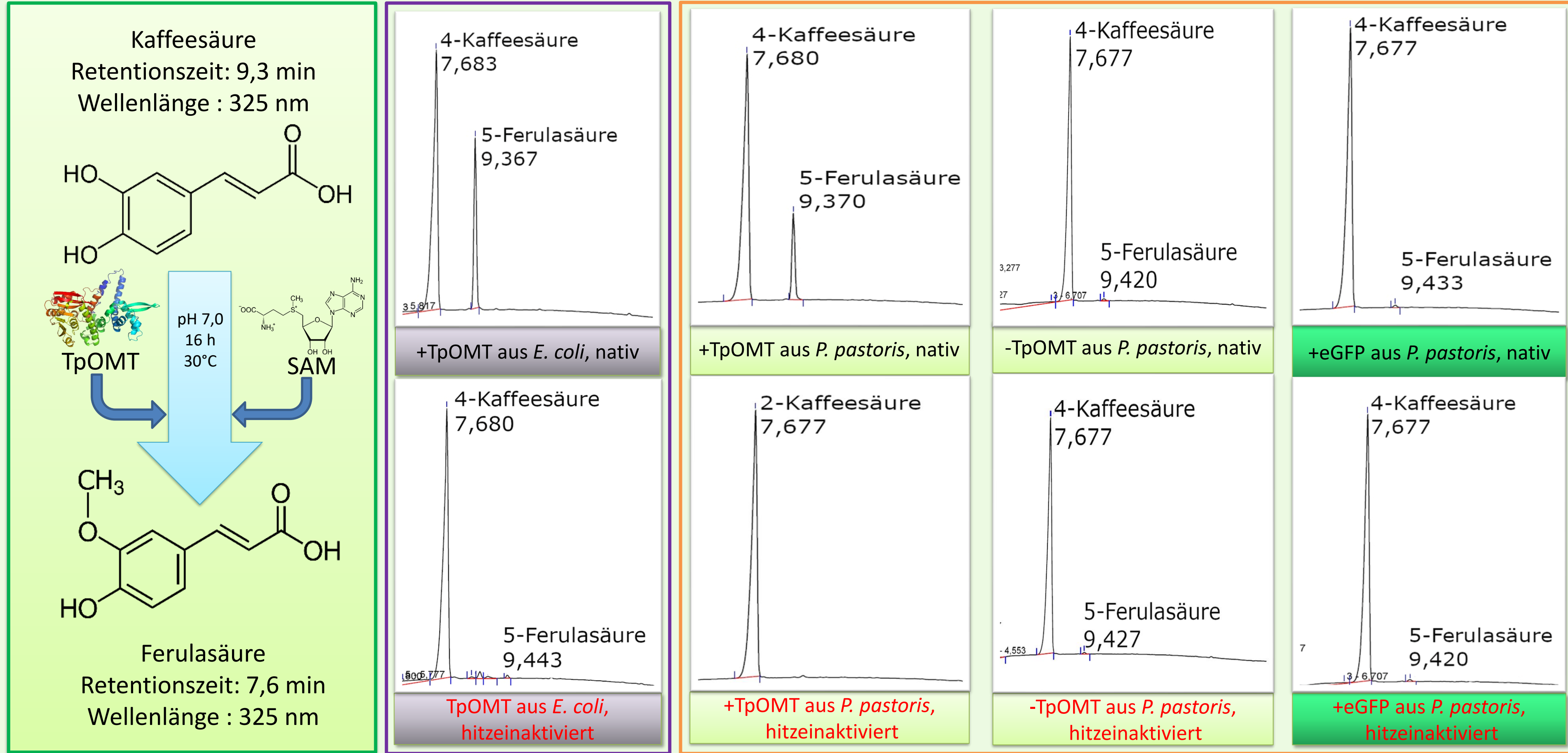
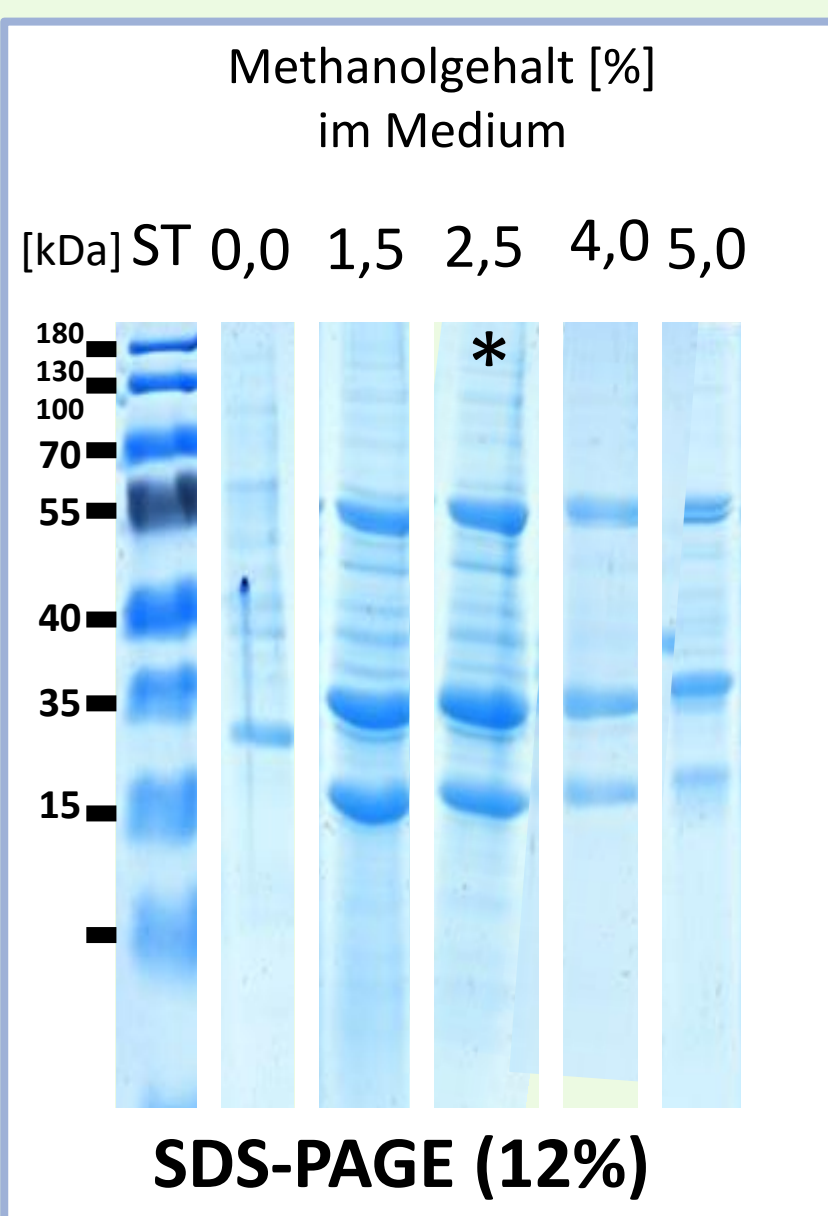


Nachweis von der Expression: SDS-PAGE- und Western-Blot-Analyse der affinitätsgereinigten TpOMT Die Produktion der TpOMT wurde in Methanol (MeOH)-induzierten und nicht-induzierten *P. pastoris*-Produktionsstämmen untersucht. Nach Metallchelate (Ni-NTA)-Affinitätschromatographie wurden die Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE untersucht. Als Kontrolle diente die rekombinante affinitätsgereinigte TpOMT aus *E.coli*. Im Western-Blot wurden mittels Anti-HisTag-Antikörper die heterolog produzierten Proteine (TpOMT, eGFP, jeweils mit Hexahistidin-Tag verknüpft) nachgewiesen.

ST Proteinstandard | PK Positivkontrolle für die TpOMT produziert durch *E. coli* | -TpOMT nicht induzierter *P. pastoris*-Stamm mit Vektor pPinkHC-TpOMT | +TpOMT induzierter *P. pastoris*-Stamm mit Vektor pPinkHC-TpOMT | +eGFP induzierter *P. pastoris*-Stamm mit Vektor pPinkHC-eGFP.

Optimierung der Induktion mit Methanol zur Expression von TpOMT in *P. pastoris*

In Vorversuchen wurde der MeOH-Gehalt im Medium zur optimalen Induktion der Expression der TpOMT bestimmt. Nach einer viertägigen Induktion wurden die Hefekulturen geerntet, aufgeschlossen und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und nach Molekulargewicht getrennt. Bei einer Induktion mit 2,5% MeOH zeigte die TpOMT (*42,4 kDa) die stärkste Bande und somit die höchste Expressionsrate. Die so ermittelten Bedingungen wurden für weitere Versuche verwendet.



Enzymtest mit TpOMT (links) und Chromatogramme der HPLC-Analytik (rechts). Gereinigte native und hitzeinaktivierte TpOMT bzw. eGFP wurden für einen Enzymtest verwendet, um die Funktionalität der TpOMT zu prüfen. Die native TpOMT ist in der Lage, durch eine O-Methylierungsreaktion Kaffeesäure in Ferulasäure umzuwandeln. Dabei wird eine Methylgruppe vom Cofaktor S-Adenosylmethionin (SAM) auf die Hydroxygruppe von Kaffeesäure übertragen. Nach einer Extraktion mit Ethylacetat:Ameisensäure (39:1) erfolgte die HPLC-Analyse unter folgenden Bedingungen: EC 250/4,6 Nucleodur 100-5 C18 ec-Säule, Lösungsmittelgradient: Wasser:Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure, Detektion UV/VIS: 325nm

05

Fazit und Ausblick

Das Enzym TpOMT wurde erfolgreich in der Hefe *P. pastoris* produziert. Nach der Feststellung der optimalen Induktionsparameter für den charakterisierten Produktionsstamm soll zukünftig die Anzucht und Induktion im größeren Maßstab (Schüttelkolben über 2 L oder Fermentation) erfolgen. Außerdem muss für die rekombinante TpOMT aus *P. pastoris* eine finale Reinigungsstrategie mittels Ni-NTA-Affinitäts- und Anionenaustausch-Chromatographie entwickelt werden. Mit der vollständig gereinigten TpOMT soll ein finaler Enzymtest erfolgen. Abschließend soll die Enzymaktivität der rekombinanten TpOMT aus *P. pastoris* mit dem in *E. coli* produzierten Enzym verglichen werden. Zukünftig sollen weitere Pflanzenenzyme in *P. pastoris* hergestellt werden, um medizinisch relevante Sekundärstoffe aus dem Hakenblatt im großen Maßstab herstellen zu können.